



ANNALES

**CONFÉRENCE INTERNATIONALE
SUR LES RAVAGEURS
EN AGRICULTURE**

**INTERNATIONAL CONFERENCE
ON PESTS IN AGRICULTURE**

TOME I

7-8-9 décembre 1993

le Corum - Montpellier

ANPP - TROISIEME CONFERENCE INTERNATIONALE SUR LES
RAVAGEURS EN AGRICULTURE
MONTPELLIER 7-8-9 DECEMBRE 1993

ANALYSE DE LA TOXICITE DE NOUVELLES SOUCHES DE *BACILLUS*
THURINGIENSIS VIS À VIS DE *CHILO SUPPRESSALIS*
(LEPIDOPTERE, PYRALIDAE)

L.M.FIUZA^{1,2}, R.FRUTOS¹, M.BETBEDER-MATIBET¹ et F.LECLANT²

¹ CIRAD , 2477 Avenue du Val de Montferrand, BP. 5035,
34032 Montpellier Cedex 1, France.

² Chaire d'Ecologie Animale et de Zoologie Agricole, ENSA-M, 2 Place Viala,
34060 Montpellier Cedex 1, France.

RESUME:

Chilo suppressalis est un foreur des tiges de riz de grande importance économique en Asie et au sud de l'Europe, en particulier en France dans les rizières de Camargue. Cinq souches de *Bacillus thuringiensis*, isolées de larves de lépidoptères malades ont été testées sur les larves de *C. suppressalis*. Parmi les cinq souches testées, deux ont montré une activité toxique contre ce ravageur avec une CL₅₀ de respectivement 0,16 et 0,35 µg.ml⁻¹. Ces souches pourraient fournir du matériel de base pour une lutte microbiologique ainsi que des gènes de toxines pour la création de riz transgéniques résistants à *C. suppressalis*.

Mots-clés: *Bacillus thuringiensis*, *Chilo suppressalis*, δ-endotoxine, CL₅₀.

SUMMARY:

The Striped Stem Borer (SSB), *Chilo suppressalis*, is a major pest on rice in Asia and in southern Europe, especially in the French growing area of Camargue. Five strains of *Bacillus thuringiensis*, isolated from diseased lepidoptera larvae were assayed on *C. suppressalis*. Two out of the five strains were active against SSB with an LC₅₀ of 0.16 and 0.35 µg.ml⁻¹ respectively. These strains might be valuable as microbial control agents or as a source of genes for SSB-resistant transgenic rice.

Key-words: *Bacillus thuringiensis*, *Chilo suppressalis*, δ-endotoxins, LC₅₀.

INTRODUCTION

Parmi les Lépidoptères, la famille des Pyralidae compte un grand nombre d'espèces d'intérêt économique. *Chilo suppressalis*, une pyrale originaire d'Asie, est l'un des principaux ravageurs du riz au Japon, mais il provoque également des dégâts dans les rizières d'Espagne, d'Italie et, depuis 1971, dans les rizières françaises (BOUNIAS, 1972).

Dans la région camarguaise, la pyrale du riz a deux générations complètes par an, parfois une troisième (POITOUT et BUES, 1978). Elle hiverne à l'état de chenille en fin de développement à l'intérieur des tiges, sous les gaines foliaires à mi-hauteur des plants de riz, ou dans des plants hôtes secondaires au bord des rizières. Le cycle complet de *C. suppressalis* peut varier de 40 à 65 jours lorsqu'il s'effectue sans diapause, dure plusieurs mois quand il y a diapause (N'DOYE, 1975). *C. suppressalis* mine les tiges du haut vers le bas de la plante. Les galeries creusées dans les tiges provoquent des altérations plus ou moins prononcées de l'épi dont la stérilité est totale ou partielle. Le dégât le plus caractéristique est l'épi blanc (AUDEMARD, 1971; SAUMONE, 1988). La protection des rizières contre cette pyrale est actuellement assurée par application aérienne d'insecticides.

Les moyens de lutte ne se limitent pas aux pesticides chimiques et plusieurs micro-organismes entomopathogènes sont employés. Parmi les bactéries, seul le genre *Bacillus* est utilisé pour combattre les insectes. A l'intérieur de ce genre, l'espèce *B. thuringiensis* offre les potentialités insecticides les plus intéressantes, tant sur le plan des applications actuelles que sur celui des perspectives de développement (LERECLUS, 1988). Plusieurs souches de *B. thuringiensis* ont été identifiées et classées en sérotypes suivant la nature de l'antigène flagellaire (DE BARJAC et BONNEFOI, 1967). Actuellement, 27 sérotypes et 7 sous-groupes sont décrits et répertoriés (DE BARJAC et FRACHON, 1990).

L'isolement de nouvelles souches de *B. thuringiensis*, à partir de chenilles de pyrales mortes ou malades a permis de fournir un matériel de base pour des tests de toxicité. Cinq souches différentes ont ainsi pu être isolées.

La résistance des insectes aux toxines de *B. thuringiensis* a été montrée et soulève le problème de l'efficacité des biopesticides avec cette bactérie. McGAUGHEY (1985) a observé ce phénomène dans les populations de *Plodia interpunctella*. Il est également signalé chez la pyrale américaine, *Homoeosoma electella* (BREWER, 1991) et *Plutella xylostella* L. (TABASHNIK *et al.*, 1991). Il devient donc important de pouvoir disposer d'autant de souches actives que possible contre un ravageur afin de pouvoir gérer au mieux le problème des résistances. C'est dans cet esprit que conjointement à la détermination de l'efficacité de plusieurs types de toxines anti-lépidoptères, des tests de toxicité ont été conduits sur *C. suppressalis* avec ces cinq souches de *B. thuringiensis*.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Élevage des insectes

Les larves de *Chilo suppressalis* utilisées dans les essais sont originaires de la Camargue, dans le sud de la France. Les insectes ont été récoltés dans les rizières et élevés au laboratoire sur milieu nutritif artificiel. La composition du milieu est proche de celle mise au point par POITOUT et BUES (1970) pour l'élevage de nombreuses noctuelles, modifiée par BETBEDER-MATIBET (1977) pour l'élevage d'*Eldana saccharina* W. et par BORDAT et PICHOT (1978, 1980) pour l'élevage de *Chilo zacconius* B. et *Sesamia calamistis* H.

Les insectes sont maintenus dans une cellule climatisée régulée à 25°C, 70% d'humidité relative, avec une photopériode de 16h, pour éviter la diapause.

Purification des corps d'inclusions parasporaux

Les souches de *B. thuringiensis* ont été multipliées dans le milieu HCT à 28°C et sous agitation (180 rpm), pendant 4 jours pour obtenir une lyse bactérienne complète ou quasi complète, selon la souche. La présence des corps d'inclusions parasporaux est mise en évidence par microscopie optique en contraste de phase.

Après une centrifugation à 4000 g pendant 15 mn pour obtenir un culot contenant les spores et les corps d'inclusions, celui-ci est suspendu dans une solution de NaCl 1M et agité vigoureusement pour entraîner la formation d'une mousse contenant la plupart des spores. Cette mousse est ensuite éliminée à l'aide d'une spatule.

Afin de dissocier les amas de corps d'inclusions, le culot obtenu est repris dans de l'eau bidistillée contenant 1mM de PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride) et incubé dans la glace, puis sonifié à 100w durant 30 sec.

La séparation des cristaux, spores, débris et cellules a été obtenue par gradient de renografin (30 à 70%), suivi d'une centrifugation à 15 000 g pendant 90 mn à 4°C. Les interfaces contenant les cristaux purs ont été récoltées, diluées cinq fois dans de l'eau bidistillée et centrifugées à 20 000 g durant 30 mn à 4°C. Après quatre rinçages, le culot est repris dans 1ml d'eau bidistillée contenant 1mM de PMSF.

Les cristaux ont été dissout dans un tampon alcalin (50mM Na₂CO₃, 10mM DTT, 5mM EDTA, 0,1mM PMSF à pH 10) et incubés 12h à 37°C. Après centrifugation durant 30mn à 20 000 g, la pureté des protoxines a été vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (LAEMMLI, 1970). La concentration des protéines a été déterminée par rapport à la protéine standard

Sérum Albumine Bovine, à l'aide du Kit microBCA (PIERCE). Les cristaux purifiés ont été aliquotés et stockés à -20°C.

Tests de toxicité

La gamme des concentrations de protéines insecticides de *B. thuringiensis* a été déterminée par des tests sériés, en utilisant des dilutions au 1/10 (BUSVINE, 1981). Lors des tests préliminaires, les valeurs de CL₅₀ ou DL₅₀ déjà obtenues contre d'autres espèces de lépidoptères ont servi de point de référence (VAN RIE et al., 1989, 1990; MACINTOSH et al., 1991; GILL et al., 1992).

Les protéines purifiés produits par les souches IGE 1, IGE 3, IGE 4, IGE 5 et IGE 6, ont été testés à six concentrations différentes, appliquées à la surface du milieu nutritif artificiel à la dose de 20 µl / 120mm². Les lots témoins ont été réalisés par substitution de la suspension des protéines par un volume équivalent d'eau distillée. Les tests de toxicité ont été conduits sur des larves de *C. suppressalis* âgées de 12 jours qui on jeûné 12 heures avant d'être placées sur le milieu traité. Chaque essais a été répété trois fois et la mortalité a été déterminée sept jours après le traitement. La concentration létale moyenne (CL₅₀) a été déterminée par l'Analyse de Probit après avoir corrigé la mortalité par la formule d'Abbott (1925).

RESULTATS ET DISCUSSION

Parmi les cinq souches testées sur les larves de *C. suppressalis* afin de déterminer le degré exact de toxicité, les souches IGE 5 et IGE 1 ont montré une forte activité. La CL₅₀ de IGE 5 et IGE 1 correspond à 0,16 µg.ml⁻¹ et 0,35 µg.ml⁻¹, respectivement. Par contre les souches IGE 6, IGE 3, et IGE 4 ont montré une faible activité toxique pour ce ravageur avec une CL₅₀ très élevée. Pour IGE 6 la CL₅₀ est de l'ordre de 744 µg.ml⁻¹ et en ce qui concerne IGE 3 et IGE 4, cette concentration est supérieure à 1000 µg.ml⁻¹, selon les résultats du tableau 1.

Les souches IGE 1 et IGE 5 présentant une activité toxique importante contre une espèce de pyrale, elles mériteraient de faire l'objet d'un criblage plus approfondi, notamment sur d'autres pyrales, afin de déterminer son spectre d'hôte. Il serait également très utile de connaître la nature des gènes présents dans cette souche.

Tableau 1 : Toxicité des souches de *Bacillus thuringiensis* vis-à-vis de *Chilo suppressalis*

SOUCHES	IGE1	IGE3	IGE4	IGE5	IGE6
CL ₅₀ (µg/ml)	0,35	> 1000	> 1000	0,16	> 700
Li (µg/ml)	0,1	/	/	0,05	/
Ls (µg/ml)	1,1	/	/	0,5	/

Li = Limite inférieure et Ls = Limite supérieure.

La caractérisation des toxines présentes dans ces souches ainsi que le clonage et le séquençage des gènes correspondants sont en cours de réalisation.

Les travaux actuellement en cours sur IGE 5 et IGE 1 ont pour objectif, au delà de la caractérisation des toxines et des gènes, de fournir un matériel de base pour une lutte microbiologique ou pour l'obtention de plants de riz transgéniques résistants à *C. suppressalis*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABBOTT, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, 18, 266-267.
- AUDEMARD, H. 1971. Note d'information sur la pyrale du riz (*Chilo suppressalis* W.). *BIRE*, 135: 9-12.
- BETBEDER-MATIBET, M. 1977. *Eldana saccharina* W., technique d'élevage sur milieu artificiel et observations sur sa biologie en laboratoire. *Agron. Trop.*, 32 (2): 173-179.
- BORDAT, D. et PICHOT, M. 1978. *Chilo zacconius* B., technique d'élevage sur milieu artificiel et observations sur sa biologie en laboratoire. *Agron. Trop.*, 32 (4): 337-343.

- BORDAT, D. et PICHOT, M. 1980. *Sesamia calamistis* H., Une technique pratique d'élevage de masse sur milieu artificiel. Agron. Trop., 35 (1): 35-40.
- BOUNIAS, M. 1972. La pyrale du riz, *Chilo suppressalis* W. (Lepidoptere, Pyralidae), éléments d'information rapide. BIRE, 139: 11-13.
- BUSVINE, J. R. 1981. Méthodes recommandées pour la mesure de la résistance des ravageurs aux pesticides. Étude FAO: production végétale et protection des plantes, 161 p.
- BREWER, G. J. 1991. Resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in the sunflower moth (Lepidoptera: Pyralidae). Environ. Entomol., 20 (1)/ 316-322.
- DE BARJAC, H. et BONNEFOI, A. 1967. Classification des souches de *Bacillus thuringiensis* ; C. R. Acad. SC. Paris, 264: 1811-1813.
- DE BARJAC, H. et FRACHON, E. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. Entomophaga, 35 (2): 233-240.
- GILL, S. S., COWLES, E.A. et PIETRANTONIO, P.V. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annu. Rev. Entomol., 37: 615 - 636.
- LAEMMLI, E.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227 : 680-685.
- LERECLUS, D. 1988. Génétique et biologie moléculaire de *Bacillus thuringiensis*. Bull. Inst. Pasteur, 337-371.
- MACGAUGHEY, W. H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science, 229 : 193-195.
- MACINTOSH, S. C., STONE, T.B., JOKERST, R. S. et FUCHS, R.L. 1991. Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins to a laboratory-selected line of *Heliothis virescens* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 1930-1933.
- N'DOYE , M.B. 1975. Etude de la sensibilité de *Chilo suppressalis* W. aux *Fungi Imperfecti* et des effets secondaires de l'infection à *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Thèse de Doctorat. Université Paul Sabatier Toulouse, 150 p.
- POITOUT, S. et BUES, R. 1970. Elevage de plusieurs espèces de Lépidoptères Noctuidae sur milieu artificiel riche et sur milieu simplifié. Ann. Zool. Ecol. Anim., 2 (1) : 79-91.
- POITOUT, S. et BUES, R. 1978. Le cycle évolutif de la pyrale du riz (*Chilo suppressalis* Walker) dans le delta rhodanien. Utilisation du piégeage sexuel. Ann. Zool. Ecol. Anim., 10 (2) : 245-265.
- SAUMONE, E. 1988. Contrôle de attaques e la pyrale du riz (*Chilo suppressalis* W.) en Camargue. Informations techniques., Centre Français du Riz, Arles, 5p.
- TABASHNIK, B.E. , FINSON, N. et JOHNSON, M. W. 1991. Managing resistance to *B. thuringiensis* : lessons from the diamondback moth (Lepidoptera, Plutellidae). J. Econ. Entomol., 84 (1) : 49-55.

VAN RIE, J., JANSSENS, S., HÖFTE, H., DEGHELLE, D. et VAN MELLAERT, H. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. Eur. J. Biochem., 186 : 239-247.

VAN RIE, J., MacGAUGHEY, W. H., JOHNSON, D.E., BARNETT, B.D. et VAN MELLAERT, H. 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science, 247 : 72-74.